

ВІДГУК
офіційного опонента на дисертаційну роботу
ШКРИЛЯ В'ЯЧЕСЛАВА МИХАЙЛОВИЧА
«РІАНОДИН РЕЦЕПТОР ОПОСЕРЕДКОВАНА КАЛЬЦІЄВА СИГНАЛІЗАЦІЯ В
М'ЯЗОВИХ І НЕРВОВИХ КЛІТИНАХ»,
представлену на здобуття ступеня доктора біологічних наук
(за спеціальністю 091 - Біологія, 03.00.02 – Біофізика)

Актуальність дисертаційної роботи. Як добре відомо, іонам кальцію (Ca^{2+}) належить фундаментальне значення у забезпеченні функціональної активності клітин практично всіх тканин. Дисертант - В'ячеслав Михайлович Шкриль як раз і займався дослідженням біофізичних механізмів контролю кальцієвої сигналізації в клітинах. Проте, в контексті дисертаційної роботи, яка буде проаналізована мною нижче, та її безперечної актуальності, варто, мабуть, перш за все, поставити запитання: чому саме Ca^{2+} є головним внутрішньоклітинним неорганічним сигналізатором, а не інші біологічно значущі іони – Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , H^+ , Cl^- ? (сподіваюся, дисертант має свої міркування з цього приводу). Хоча наразі ми далеко не все ще знаємо з цього питання, втім, все ж таки, дещо варто відзначити.

Так, для іону Са є властивим утворення великої кількості координаційних зв'язків – переважно 6 чи навіть більше. Довжина зв'язку, що утворюється при взаємодії іону Са з лігандами, варіює (наприклад, для зв'язку Са-О – 0,23 – 0,26 нм). Внаслідок вищенаведеного іон Са здатний “підлаштовуватися” під гнучку структуру сайту зв'язування на різноманітних протеїнах. Цей іон за фізіологічних температур не здатний утворювати зв'язки з атомами азоту у складі протеїнових молекул. Для іонів Са є властивим вельми динамічний обмін на рівні їхніх комплексів з різноманітними лігандами та мембранними структурами: має місце багатоекспоненційна кінетика (ідентифікуються 3 – 5 експонент) цього процесу в тканинах і клітинах (режим ізотопного $^{40}\text{Ca}^{2+}$ - $^{45}\text{Ca}^{2+}$ обміну, використання Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних зондів). Ca^{2+} виявляє свою сигнальну дію завдяки існуванню суттєвого власного трансмембранного градієнту; так, на рівні плазматичної мембрани величина вільної енергії Гіббса у випадку спрямованого у клітину кальцієвого градієнту (тобто зміна парціального електрохімічного потенціалу) в розрахунку на 1 моль Ca^{2+} $\Delta G_{\text{пм}} = RT \ln \{ [\text{Ca}^{2+}]_e / [\text{Ca}^{2+}]_i \} + 2F \Delta \psi \sim -40$ кДж/моль. Мобілізація іонів Са з внутрішньоклітинного кальцієвого депо – ендо/саркоплазматичного ретикулуму здійснюється не лише внаслідок електричних процесів на мембранах, але й хімічним шляхом (наприклад, під дією інозитолтрифосфату IP_3). Гомеостаз іонів Са в клітинах забезпечується узгодженим функціонуванням різноманітних енергонезалежних та енергозалежних Ca^{2+} -транспортувальних систем - кальцієвих каналів, мембранних рецепторів (зокрема, ріанодинових), кальцієвих помп, обмінників, симпортерів, унипортерів та антипортерів. Мишенями для іонів Са можуть слугувати як “розчинні” (наприклад, кальмодулін), так і інтегральні мембранні рецепторні, ензиматичні та транспортні протеїни.

Втім, мабуть легше перерахувати ті фізіологічні та біохімічні процеси, в яких іони Са не задіяні, ніж ті, які ці іони контролюють. А регулюють іони Са, наприклад, такі найважливіші загальнобіологічні феномени, як внутрішньоклітинний сигналінг, скорочення м'язів, збудження, вивільнення медіаторів, синаптична пластичність, секреція, запліднення, транскрипція генів, апоптоз, міжклітинна взаємодія, іонний

транспорт (згадаємо Na^+ - Ca^{2+} чи H^+ - Ca^{2+} обмін), гліколіз і гліюконеогенез, активація багатьох ензимів тощо. Прецизійна регуляція концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі є надзвичайно важливою для забезпечення нормального функціонування збудливих клітин. Більш того, з недотриманням цієї регуляції пов'язана низка дуже небезпечних патологій – мова йде за різні нейропатії, діабет, порушення скоротливої функції м'язів – скелетних, міокарду, гладеньких (і тут можна згадати гіпо- та гіпертензію; атонію кишкового тракту та інші патології його моторики; астму; гіпо- та гіпертонус матки, викидні, спонтанні аборти, маточні кровотечі тощо).

Іншими словами – вивчення біофізичних та біохімічних механізмів регуляції внутрішньоклітинного кальцієвого сигналу (на іонному, молекулярному, мембранному та клітинному рівнях) (тобто, намагання з'ясувати - «як воно працює»?) – це найважливіша виключно актуальна фундаментальна міждисциплінарна проблема сучасної фізико-хімічної біології незалежно від того, хто її досліджує – фізіологи, біофізики чи біохіміки. І я б додав – ця проблема фантастично цікава, такою вона була, є наразі і ще тривалий час буде, я думаю!

Ось чому є вагомим підстави стверджувати, що дисертаційна робота Шкриля В'ячеслава Михайловича, яка присвячена з'ясуванню ролі ріанодинових рецепторів у контролі концентрації іонів Ca у збудливих - м'язових і нервових – клітинах (на рівні суто клітини, чи окремої її ділянки), **є актуальною у фундаментальному (науково-теоретичному) аспекті. Але масмо у цій проблемі й найважливіший практичний аспект.** Справа в тому, що ріанодинові рецептори можуть слугувати потенційними мішенями для нових фармакологічних препаратів з метою лікування різноманітних захворювань, пов'язаних з порушенням внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу (наприклад - м'язова дистрофія, аритмії серця, нейродегенеративні захворювання тощо). Тобто мова йде за так звану «таргетну терапію».

Перед тим, як написати цей Відгук, опонент:

- 1.Прочитав дисертацію та її автореферат;
- 2.Ознайомився з вибраними друками дисертанта (читав відбитки авторських друків в оригіналі);
- 3.Мав з ним особисту зустріч, під час якої В'ячеслав Михайлович надав мені додаткові роз'яснення щодо окремих результатів своєї роботи, які викликали в мене запитання.

На підставі вищезазначеного формую своє враження від дисертаційної роботи В.М. Шкриля (Відгук викладено на 10 стор., шрифт – 12).

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота, яка викладена на 296 стор., за своєю структурою є достатньо канонічною і складається із класичних частин: АНОТАЦІЯ; ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ; ПЕРЕЛІК ОСНОВНИХ УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ; ЗМІСТ; ВСТУП; РОЗДІЛ 1. В ньому проаналізовані особливості змін внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у кардіоміоцитах. Так, тут наведені експериментальні дані та обговорюються питання щодо: - ролі іонів Ca у спряженні збудження і скорочення у кардіоміоцитах, - реєстрації процесів вивільнення Ca^{2+} в

кардіоміоцитах з використанням методу високошвидкісної конфокальної мікроскопії, - активності ріанодинових рецепторів як поодиноких структур вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму та спалахів концентрації Ca^{2+} , що були виявлені за допомогою чотиривимірної конфокальної мікроскопії, - двофарбних Ca^{2+} -зображень стимулу та кальцієвої відповіді в кардіоміоциті, - інноваційного підходу до просторово-складної дифракційно обмеженої фотоактивації та фотознебарвлення в живих клітинах, - рефрактерних властивостей процесу вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму як детермінанта Ca^{2+} альтернацій у міоцитах передсердь; РОЗДІЛ 2. В цьому розділі мова йде за транзйентні зміни концентрації внутрішньоклітинного Ca^{2+} у випадку скелетного м'язу за рахунок вивільнення цього катіону з головного внутрішньоклітинного кальцієвого депо - саркоплазматичного ретикулуму. Тут увагу приділено: - опису ефектів тунелювання Ca^{2+} від саркоплазматичного ретикулуму до мітохондрій, - окисно-відновному стану мітохондрій та Ca^{2+} -спалахам в пермеабілізованому скелетному м'язі ссавців, - характеристиці впливу активних форм кисню на Ca^{2+} -сигнали, спричинені осмотичним шоком в інтактних скелетних м'язових волокнах, - взаємному посиленню сигналів активних форм кисню та Ca^{2+} під час стресу в дистрофічних м'язових волокнах скелетних м'язів, - Ca^{2+} -індукованій активації ріанодинових рецепторів та вивільненню Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму скелетних м'язів); І, нарешті, РОЗДІЛ 3, що присвячений вивченню потоків іонів Ca^{2+} у нейронах. У цьому розділі акцентується увага на: - вивченні внутрішньоклітинних потоків цих іонів у збудливих клітинах, - проведенні корекції похибки через віднімання фону при раціометричних вимірюваннях концентрації Ca^{2+} за допомогою камери з пристроєм з зарядовим зв'язком, - дослідженні питань, що стосуються просторово-часових властивостей кальцієвих транзйентів у нейронах гіпокампу in vitro. Дисертація також містить ЗАКЛЮЧНИЙ розділ та розділи ВИСНОВКИ і СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.

Я повинен відзначити, що фактичні дані, що наведені в роботі, чудово проілюстровані великою кількістю одиниць графічного матеріалу (рисунок, графіки, діаграми, часто-густо вони виконані в кольорі). І я це вітаю, бо це активно сприяє кращому розумінню даних, що були одержані автором.

В цілому ж структура та обсяг дисертаційної роботи В.М.Шкриля уявляються мені цілком слушними.

Ступінь обґрунтованості, достовірності наукових положень, висновків, рекомендацій. Як на мене, то достовірність одержаних у роботі результатів забезпечена, перш за все, **використанням адекватних експериментальних підходів та методів**, надійною статистичною обробкою даних, що були накопичені при її виконанні .

І тут хочу відзначити, що при виконанні роботи був задіяний широкий спектр різноманітних сучасних експериментальних методів, переважно біофізичних. В цілому ж мова йде за методи: епіфлуоресценції та конфокальної мікроскопії з використанням Ca^{2+} -чутливих флуоресцентних зондів для дослідження внутрішньоклітинних кальцієвих транзйентів; петч-клемпа в конфігурації «ціла клітина» для реєстрації трансмембранних Ca^{2+} струмів; тестування локального вивільнення зв'язаного кальцію під час фотолізного спалаху з кальцієвого буфера; комп'ютерного моделювання та обробки кальцієвих сигналів для розрахунку кальцієвих потоків; статистичної обробки одержаних результатів. При проведенні експериментів активно використовувалися різноманітні флуоресцентні зонди: Fluo-4, Fluo-5N, Mag-rhod-2, CM-H2DCFDA (DCF) тощо. Справляє добре враження ретельний методичний опис автором постановки експериментів, які проводилися.

Наукові положення та висновки, сформульовані в текстах дисертації та її автореферату, практично повністю віддзеркалюють суть експериментальних результатів, одержаних автором.

Отже, в цілому опонент стверджує, що достовірність наукових положень, висновків та рекомендацій, викладених в дисертаційній роботі, не викликає сумнівів.

Повнота викладення результатів роботи в опублікованих працях. Основні результати дисертації достатньо повно відображено у фахових наукових виданнях, ці результати було апробовано на різноманітних вітчизняних і міжнародних спеціалізованих наукових форумах. В цілому ж мова йде за: - 12 статей (у переважній більшості випадків дисертант є першим автором), - один розділ у нейрофізіологічному нарисі, - патент на корисну модель, - 27 тез на рівні міжнародних конференцій та з'їздів.

Наукова новизна отриманих результатів. Я б відзначив, перш за все, наступне. По-суті, робота є комплексною – вона має потужні як **фундаментальну**, так і **практичну**, а також суто **методичну** компоненти (мова йде за нові методичні розбудови). В ній представлені пріоритетні та оригінальні результати як наслідок суперпозиційного дослідження молекулярних, мембранних та клітинних механізмів, які забезпечують прецизійну регуляцію концентрації вільного Са в цитоплазмі клітин збудливих тканин з акцентом на вивчення ролі ріанодинових рецепторів, що відповідають за вивільнення Ca^{2+} з ендо/саркоплазматичного ретикулуму в цитозоль. Безсумнівно, приймаючи до уваги той безперечний факт, що звільнення іонів Са з найважливішого внутрішньоклітинного кальцієвого депо – ретикулуму має велике значення для забезпечення функціонування м'язів (скелетних, міокарду, гладеньких) і нервової системи, можна лише підтвердити наступне: будь-які наукові розбудови з цієї проблеми мають велике теоретичну та практичну вагомість.

Я б, перш за все, акцентував увагу на наступних блоках авторських пріоритетних експериментальних та концептуальних результатів, що були одержані при виконанні дисертації:

1. Фундаментальний аспект. Завдяки авторським дослідженням були одержані нові дані щодо функції ріанодинових рецепторів у модуляції концентрації Ca^{2+} в цитоплазмі клітин збудливих тканин. Я маю на увазі комплекс біофізичних даних щодо властивостей кальцієвого сигналіngu в м'язових і нервових клітинах на рівні як окремих субклітинних органел – плазматичної мембрани, саркоплазматичного ретикулуму та мітохондрії, так і на рівні мікроклітинних доменів та центрів вивільнення іонів Са шляхом регуляції окислювально-відновлювального стану клітини, мітохондрійного NADH сигналу або за участі мембранних кальцієвих каналів L-типу та активності ріанодинових рецепторів у випадку Ca^{2+} -індукованого вивільнення кальцію. Мені уявляється, зокрема, дуже суттєвим наступне: з використанням біофізичних методів автором було підтверджено існування двох різних типів структурно-функціональних взаємозв'язків між мітохондріями та саркоплазматичним ретикулумом у м'язових волокнах. Виявилось, що деяка частина мітохондрійної популяції розташована на певній відстані від місць вивільнення Ca^{2+} з ретикулуму, але значна кількість мітохондрій мають прямиий

функціональний (і, імовірно, структурний) контакт із ретикуломом. Я б також відзначив таку авторську знахідку: доказ залежності появи Ca^{2+} спалахів у пермеабілізованих м'язових волокнах від окислювальної активності. Отже, є всі підстави стверджувати, що робота В.М.Шкриля вирішує важливу фундаментальну наукову проблему щодо з'ясування закономірностей впливу та формування внутрішньоклітинного кальцієвого сигналу за участі ріанодинових рецепторів при модуляції останніх за рахунок активних форм кисню, NADP(H)-оксидази, взаємозв'язку з мітохондрійним Ca^{2+} та NADH сигналом, електричною стимуляцією, що було виявлено за допомогою швидкої конфокальної мікроскопії та раніше не було досліджено. Змістовною є концептуальна схема, що наведена на рис. 4.1 (як в тексті дисертації, так і в тексті реферату) та присвячена схематичному зображенню вивільнення іонів Ca з внутрішньоклітинного депо за участі ріанодинових рецепторів. В цілому ж можна стверджувати, що дослідження В.М.Шкриля суттєво поглиблюють наше розуміння фундаментальних біофізичних механізмів контролю такого видатного загальнобіологічного феномену, як внутрішньоклітинний кальцієвий сигналінг, сприяє розумінню цього феномену як кооперативного, нелінійного, неадитивного, синергістичного явища, для якого властива наявність мережі позитивних і негативних зворотних зв'язків.

2. Практичний аспект. Я вважаю, що вибрані результати, що були одержані при виконанні роботи, дійсно є перспективними для розробки нових підходів щодо лікування небезпечних патологій, зокрема при порушеннях скоротливої функції серця (альтернація серця), в тому числі й серцевих аритмій. В більш широкому аспекті можна навіть стверджувати, що, в контексті одержаних при виконанні дисертації даних, з'ясування закономірностей спрямованого регулювання активності ріанодинових рецепторів надає нам можливість зрозуміти молекулярні основи виникнення різних захворювань, які пов'язані з дисфункцією зазначених рецепторів, а це суттєво для розробки нових терапевтичних підходів для лікування патологій (можливо це і є «молекулярна медицина»? Бо зараз за неї багато кажуть).

3. Розбудова нових методик. Дуже важливо, що в процесі виконання роботи дисертантом були започатковані нові методичні підходи щодо вивчення внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу та з'ясування ролі ріанодинових рецепторів у його контролі. Ось що я маю на увазі.

а/було запропоновано методичні підходи для дослідження Ca^{2+} -спалахів у місці вивільнення іонів Ca з саркоплазматичного ретикулуму з використанням тривимірного конфокального сканування;

б/з використанням швидкісної конфокальної візуалізації для дослідження кальцієвих сигналів були запропоновані методичні підходи для вивчення біофізичних процесів в збудливих клітинах, Ca^{2+} -сигналів з часовою роздільною здатністю;

в/був запропонований новий метод просторової, складної, дифракційно-обмеженої фотоактивації та фотознебарвлення в живих клітинах. Така методика дозволяє локально активувати окремі сайти вивільнення Ca^{2+} або групу ріанодинових каналів у живих клітинах, що може бути використано для високоточного вивчення їхніх структурних і функціональних властивостей.

Втім, не можу не відзначити, що при виконанні цього біофізичного дослідження автор активно використовував **кількісні підходи, і це дуже добре, бо біофізика – кількісна наука (бо яка ж біофізика без математики?)**. І тут варто підкреслити, що автор має чудову одноосібну оглядову статтю, що присвячена кількісній оцінці внутрішньоклітинних кальцієвих потоків у збудливих клітинах (2016

р.). Разом із закордонними колегами з США, Японії та Уругваю, мали місце напрацювання у галузі теоретичної біофізики внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу. Мова йде за наступне. 1. Був здійснений відповідний розрахунок для моделі використання двох барвників з однаковим флуорофором з метою визначення внутрішньоклітинної концентрації іонів Ca (були одержані достатньо складні вирази для визначення $[Ca^{2+}]_i$, що містять вельми «навантажені» радикали). 2. Також у випадку скелетного м'язу було запропоновано математичну модель (із залученням оператора Лапласа – по суті, використовувалися рівняння математичної фізики): мова йде за диференціальні дифузійно-реакційні рівняння другого порядку у часткових похідних для розрахунку концентрації іонізованого Ca в міоплазмі та кальцієвого потоку, а також встановлення зв'язку між флуоресцентним сигналом Ca^{2+} -чутливого зонду (Fluo-3, Fluo-4) та концентрацією іонів Ca. 3. Окрім того, я б відзначив авторські (у співавторстві) математичні розрахунки, які були налаштовані на корекцію похибки через віднімання фону при раціометричних вимірюваннях концентрації Ca^{2+} за допомогою камери з пристроєм із зарядовим зв'язком. Було модифіковано формулу Грінкевича для визначення концентрації Ca в клітині при двохвильовому методі збудження флуоресцентного барвника при використанні зазначеної камери. Модифікація включала в себе корекцію фотознебарвлення та виправлення помилки віднімання фону. (Я тут не можу не згадати дослідження нашого відомого біофізика проф. В.Л.Зими, який у свій час проаналізував вплив концентрації протонів H^+ , в'язкості та білкового оточення на флуоресценцію Ca^{2+} -чутливих похідних ВАРТА, що використовуються у клітинній біофізиці з метою вивчення внутрішньоклітинних кальцієвих транзєнтів, і також відповідним чином модифікував формулу Грінкевича).

Безперечно, я впевнений, що всі вищеперераховані методичні, методологічні та математичні авторські знахідки будуть корисними як для самого В.М.Шкриля, так і для його колег, які у подальшому будуть продовжувати досліджувати актуальні біофізичні проблеми, що пов'язані з вивченням внутрішньоклітинного кальцієвого сигналіngu.

І тут я хотів би звернути увагу на наступне. Хоча ця робота цілком слушно захищається за спеціальністю – 091 «Біологія» (03.00.02 – біофізика), втім, вона, по-суті, є **міждисциплінарною**. Неважко побачити, що, як в методологічному, так і в методичному аспекті дисертацію виконано «на перехресті» різних наук: «БІОФІЗИКА» + «ФІЗІОЛОГІЯ» + «БІОФІЗИЧНА ХІМІЯ» + «БІОМЕДИЦИНА». Я відверто вітаю таку «суперпозицію», бо вона цілком віддзеркалює сучасну тенденцію розвитку НАУК ПРО ЖИТТЯ в XXI сторіччі.

В цілому ж хочу відзначити, що дослідження В.М.Шкриля виконані на високому науково-методичному рівні, а експериментальні та теоретичні методи (біофізичні, фізіологічні, фізико-хімічні, математичні), що були ним застосовані, цілком є адекватними науковій меті та науковим завданням. Адже дисертанту вдалося, на рівні виконання циклу комплексних біофізикохімічних досліджень, одержати нову інформацію щодо особливостей регуляції кальцієвого сигналу в м'язових і нервових клітинах; так, зокрема, із застосуванням швидкої конфокальної мікроскопії було ґрунтовно вивчено локальні та глобальні кальцієві сигнали в зазначених клітинах. Одержані дані кваліфіковано проаналізовані, переважно - по ходу викладання експериментального матеріалу. Як вже підкреслювалося вище, наукові положення та висновки, що були сформульовані на підставі аналізу одержаного фактичного матеріалу, базуються на достатній кількості

експериментів, вони є цілком обґрунтованими та достовірними, та, безперечно, відображують основний зміст дисертаційної роботи.

Практична цінність дисертації. Очевидно, що дисертантом були одержані оригінальні експериментальні результати у галузі біофізики збудливих тканин, які мають й практичну спрямованість. Адже актуальність досліджень участі ріанодинових рецепторів в кальцієвій сигналізації пов'язана з тим, що вони потенційно можуть слугувати мішенями у випадку створення (у співпраці разом з хіміками-органіками та фармакологами) нових ліків з метою боротьби з різними захворюваннями, які виникають як наслідок порушення внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації (нейропатії, дистрофія скелетних м'язових волокон, серцева аритмія тощо). Окрім того, варто прийняти до уваги й ті практичні методичні підходи, на які опонент вже акцентував увагу вище: тривимірне конфокальне сканування та швидкісну конфокальну візуалізацію у дослідженні Ca^{2+} -спалахів у місці вивільнення іонів Ca з саркоплазматичного ретикулуму, вивчення Ca^{2+} -сигналів з часовою роздільною здатністю, а також метод просторової, складної, дифракційно-обмеженої фотоактивації та фотознебарвлення в живих клітинах. В практичному аспекті усі ці методичні знахідки є вкрай важливими та перспективним для подальшого використання дослідниками, які займаються вивченням актуальних питань сучасної клітинної біофізики, зокрема, у галузі дослідження фізико-хімічних та біофізичних проблем внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації.

Стверджую, що результати, які були одержані при виконанні дисертаційної роботи, мають **загальнобіологічне значення**.

У той же час, я б хотів сформулювати деякі **зауваження та запитання до дисертанта:**

1. Мені не здається максимально вдалою назва роботи - «Ріанодин рецептор опосередкована кальцієва сигналізація в м'язових і нервових клітинах». Звичайно, це вже сталося. Але я думаю, що краще було б на українській мові назвати роботу, наприклад, так: «Кальцієва сигналізація в клітинах збудливих тканин, що опосередкована ріанодиноними рецепторами». Мабуть можливими були, й інші варіанти назви роботи.

2. Робота уявляється мені дещо гетерогенною. Дійсно, предметом дослідження було вивчення гомеостазу іонів Ca в кардіоміоцитах, клітинах скелетних м'язів та пірамідальних нейронах гіпокампу; експерименти були виконані на тканинах ссавців (миша, щур) та земноводних (жаба). Втім, я не виключаю, що в контексті більш логічної побудови роботи, **було б слушним проведення порівняльного вивчення кальцієвого сигналіngu** у випадку, наприклад, лише м'язової тканини - скелетних м'язів, міокарду, а також гладеньких м'язів ссавців. Проте очевидно, що науковий ступінь доктора наук присуджується не за те, що можна було б зробити, а за те, що було зроблено. А об'єктивно треба визнати, що зроблено дисертантом було дуже багато.

3. В роботі автор вказує: « Ca^{2+} -транзйенти також індукували хімічно, застосовуючи деполяризуючий розчин, який містив 50,0 мМ KCl, що заміщував відповідну кількість NaCl в позаклітинному розчині». Але опонент впевнений, що автор дисертації чудово знає, що у плазматичній мембрані нервових клітин та кардіоміоцитів функціонує електрогенний $n\text{Na}^+-1\text{Ca}^{2+}$ обмінник, де стехіометричний

коефіцієнт $n = 3-4$. Як відомо, термодинамічний аналіз, проведений в рівноважному режимі ($n\Delta\mu_{Na} = \Delta\mu_{Ca}$, де $\Delta\mu_{Na}$ та $\Delta\mu_{Ca}$ – трансмембранна різниця електрохімічних потенціалів для іонів Na та Ca відповідно), приводить до наступного класичного рівняння для концентрації іонів Ca в клітині $[Ca^{2+}]_i$, яка контролюється іонним антипортером:

$$[Ca^{2+}]_i = [Ca^{2+}]_e \left(\frac{[Na^+]_i}{[Na^+]_e} \right)^n \exp[(n-2)F\Delta\phi/RT],$$

де $[Ca^{2+}]_e$ – концентрація іонів Ca в позаклітинному просторі, $[Na^+]_i$ та $[Na^+]_e$ – концентрація іонів Na в цитоплазмі та у позаклітинному просторі відповідно, $\Delta\phi$ – трансмембранний електричний потенціал, T – температура ($^{\circ}K$), F – число Фарадея, R – газова стала. Отже, у випадку калієвої деполаризації, індукованої ізотонічною заміною 50 мМ NaCl на KCl, зміна концентрації іонів Ca в клітині буде відбуватися не лише за рахунок надходження цих іонів через кальцієві канали, але й, відповідно до вищенаведеного рівняння, за рахунок зміни активності катіонного антипортера (згідно вищенаведеного рівняння, по-перше, при заміні 50 мМ $Na^+ \rightarrow 50$ мМ K^+ зменшується величина вхідного Na^+ -градієнту, по-друге, при такій заміні змінюється величина трансмембранного електричного потенціалу $\Delta\phi$). То формулюю запитання: чи має, з точки зору дисертанта, ця обставина (тобто можлива причетність електрогенного nNa^+-1Ca^{2+} обмінника плазматичної мембрани до формування кальцієвого транзієнту) якесь значення для авторської інтерпретації результатів, що були одержані?

4. Не дуже зрозуміло, навіщо в дослідах використовували такі високі концентрації селективного інгібітора SERCA помпи тапсигаргіну – 1 мМ (наприклад, див. рис. 1.2 автореферату)? Адже така концентрація інгібітору на декілька порядків більша, ніж величина константи інгібування $I_{0.5}$ у випадку тапсигаргіну. За таких високих концентрацій зазначеного інгібітору окрім, звичайно, надійного гальмування активності SERCA помпи, не можна виключати непередбачуваних наслідків щодо впливу його на будь-які інші біохімічні процеси в клітині. Так, наприклад, опоненту відомі випадки інгібувальної дії тапсигаргіну, що був використаний у занадто великих концентраціях, на АТФ-гідролазну активність скоротливих протеїнів м'язу.

5. Нажаль, в тексті автореферату дисертації практично не знайшли опису здобутки автора (разом з закордонними колегами) у галузі теоретичної біофізики внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу (хоча маємо відповідний матеріал на рівні відбитків статей у тексті суто дисертації). Принаймні у «Висновках», як у тексті дисертації, так і в її авторефераті, варто було б акцентувати увагу на адаптованій та модифікованій формулі Грінкевича для визначення концентрації вільного кальцію в клітині при двохвильовому методі збудження флуоресцентного барвника – це важливо!

6. Заключний розділ дисертації є занадто лаконічним – у тексті роботи він викладений на 1,5 сторінках. А шкода – я думаю, що автору було б тут що обговорити (хоча, заради справедливості, треба визнати, що систематичне обговорення автором власних результатів має місце протягом всього тексту роботи).

7. В тексті автореферату роботи зустрічаються граматичні та стилістичні недоопрацювання.

Втім, я повинен однозначно сказати, що вищенаведені зауваження не стосуються основних результатів дисертаційної роботи, вони не б'ють в «наукове коріння» дослідження і переважно мають рекомендаційний та профілактичний характер, бо спрямовані на подальші авторські наукові дослідження, і не впливають на мою загальну позитивну оцінку одержаних наукових результатів роботи та відповідних висновків.

Дисертація та її автореферат написані зрозумілою науковою мовою, їхні тексти добре оформлені.

На останок хочу підкреслити наступне. Біофізики, біохіміки та фізіологи України завжди тримали у фокусі уваги наукові питання, що стосувалися вивчення молекулярних, мембранних та клітинних механізмів регуляції концентрації іонізованого Са в цитоплазмі збудливих тканин – нервової та м'язової. Безперечно, ми, в контексті цього твердження, перш за все, **повинні віддати належне світлій пам'яті видатного вченого – фізіолога та біофізика академіка НАН України Платона Григоровича Костюка, який вніс значний внесок у вивчення біофізичних механізмів регуляції концентрації іонів Са в нервових клітинах.** Саме тому наразі я з приємністю хочу відзначити, що й на теперішній час в Інституті фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України зберігається увага, відповідно до традицій, започаткованих Платоном Григоровичем, до проблеми внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в тканинах. Свідченням цього і є дисертаційна робота Шкриля В'ячеслава Михайловича. І я думаю, що було б дуже добре, якщо б автор дисертації підготував на її основі **монографію**, присвячену біофізичним - молекулярним, мембранним та клітинним - механізмам регуляції концентрації іонів Са в клітинах збудливих тканин, **у якій би систематизував, узагальнив та проаналізував власні та літературні дані із сучасного стану відповідної проблеми.** Мені здається, це була б цікава монографія як для біофізиків, так і для біохіміків, фізіологів, фармакологів та клітинних біологів, які працюють у галузі фізико-хімічної біології нервових та м'язових клітин.

Висновок. Вважаю, що дисертація В'ячеслава Михайловича Шкриля «РІАНОДИН РЕЦЕПТОР ОПОСЕРЕДКОВАНА КАЛЬЦІЄВА СИГНАЛІЗАЦІЯ В М'ЯЗОВИХ І НЕРВОВИХ КЛІТИНАХ» є завершеною комплексною науково-дослідною роботою у галузі біофізики, яка робить суттєвий внесок у з'ясування ролі ріанодинових рецепторів у модуляції концентрації іонів Са у збудливих - м'язовій і нервовій - тканинах на рівні суто клітини, чи окремої її ділянки. Не має сумнівів: ця робота є актуальною як в фундаментальному (науково-теоретичному), так і в практичному аспекті. Робота є авторитетною в методичному аспекті. Можна стверджувати, що ця робота, яку було виконано, зокрема, з використанням методу швидкої конфокальної мікроскопії, вирішує важливу наукову проблему щодо пізнання біофізичних механізмів формування внутрішньоклітинного кальцієвого сигналу за участі ріанодинових рецепторів при модифікації їх функціонування активними формами кисню, NADP(H)-оксидазою, мітохондрійним Са²⁺ та NADH сигналом, у випадку електричної стимуляції. Для неї, як для справжнього біофізичного дослідження, є властивим кількісне тлумачення одержаних результатів, що слід вітати. Результати, що були одержані при виконанні роботи, є перспективними для створення (у подальшій співпраці разом з хіміками-органіками та фармакологами) нових ліків з метою боротьби з різними захворюваннями, які виникають як наслідок порушення внутрішньоклітинної кальцієвої сигналізації (нейропатії, дистрофія скелетних м'язових волокон, серцева аритмія тощо). Дисертація, хоча й захищається у галузі біофізики, має ознаки міждисциплінарного дослідження, бо її виконано «на стику» «БІОФІЗИКА» + «ФІЗІОЛОГІЯ» + «БІОФІЗИЧНА ХІМІЯ» + «БІОМЕДИЦИНА». Наукові положення та висновки, сформульовані на підставі аналізу одержаного фактичного матеріалу, є цілком

обґрунтованими та достовірними, та, безперечно, відображують основний зміст дисертаційної роботи. Безсумнівно, результати, що були одержані, зацікавлять як біофізиків, так і біохіміків, фізіологів (зокрема тих, які займаються дослідженнями у галузі молекулярної фізіології), а також фармакологів та клітинних біологів, які працюють у галузі фізико-хімічної біології нервових та м'язових клітин.

За актуальністю та обсягом, новизною та науково-практичною значимістю ця робота відповідає усім вимогам, що висуваються до докторських дисертацій - п.п. 7 та 9 «Порядку присудження та позбавлення ступеня доктора наук», затвердженого Постановою КМУ № 1197 від 17.11.2021р., а її автор – **ШКРИЛЬ В'ячеслав Михайлович**, цілком заслуговує на присудження йому наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.02 - біофізика.

Офіційний опонент:

академік НАН України, доктор біологічних наук, професор,
заступник директора з наукової роботи, завідувач відділу біохімії м'язів
Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Сергій Костерін
Заслужений діяч науки і техніки України,
Лауреат Державної премії України в галузі науки і техніки,
Лауреат премії ім. академіка О.В.Палладіна НАН України,
Лауреат премії ім. академіка П.Г.Костюка НАН України.

9 травня 2024 р.

